Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 13, No. 3, Fall 2021, p. 429-440

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۳، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، ص. ۴۴۰-۴۲۹

مقاله علمی- پژوهشی

تولید و بررسی ویژگی‌های آنزیم نوترکیب ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند

مهسا ضابطیان[۱]، محمدرضا نصیری[۲*]، علی جوادمنش[۳]، شاهرخ قوتی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۶

ضابطیان، م.، م. ر. نصیری، ع. جوادمنش، و ش. قوتی. ۱۴۰۰. تولید و بررسی ویژگی‌های آنزیم نوترکیب ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند. پژوهشهای علوم دامی ایران ۱۳(۳): ۴۴۰-۴۲۹.

چکیده

همان‌طورکه تحقیقات گوناگون نشان داده‌اند، در سال‌های اخیر، میزان مرگ‌ومیر براثرِ سرطان رشد چشمگیری داشته است؛ به‌همین‌دلیل است که محققان درپیِ تولید داروهای جدید، به‌ویژه داروهایی با اثرات جانبی کمتر، هستند. برهمین‌اساس، آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند نیز یکی از بهترین اورتولوگ‌ها برای آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاو است که آن را در القای مرگ سلول‌های سرطانی به‌کار می‌گیرند. آنزیم گوسفندی تنها در ۴ اسیدآمینهٔ A19S، K37Q، V46F و N103E با آنزیم گاوی تفاوت دارد. در مطالعهٔ پیش‌رو، ابتدا شکل سه‌بعدی آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند پیش‌بینی و سپس ازنظر پایداری بررسی شد. درادامه، مشخصات فیزیکو شیمیایی این آنزیم با برنامه پرات پارام نیز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، با استفاده ازروش‌های بیوانفورماتیکی شبیه‌سازی و باتوجه به RMSF، RMSD و Gyration analyses میزان پایداری پروتئین نیز پیش‌بینی گردید. مطالعات آزمایشگاهی نیز از قبیل بررسی فرار این آنزیم از RI، میزان مقاومت آن درمقابل پپسین، غلظت پروتئین تولیدی، قابلیت القای مرگ سلولی در سلول های سرطانی و نیز میزان فعالیت این آنزیم، انجام گرفت. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که آنزیم مدنظر پس از ۲۲ ساعت انکوبه در مجاورت پپسین تا ۹۰٪ دست‌نخورده باقی می‌ماند. میزان غلظت پروتئین تولیدی نیز 4.78 mg/ml بود که با استفاده از روش برادفورد تخمین زده شد. در این مطالعه فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز طبیعی پانکراس گوسفند 558±22 U/mol برآورد شد. همان‌طورکه در تحقیقات گذشته نشان داده شده است، انواعِ RNaseA گاو و گوسفند نمی‌توانند وارد سلول شوند و درنتیجه هیچ‌گونه سمیت سلولی نشان نمی‌دهند، ولی در این مطالعه با استفاده از لیپوفکتامین، این آنزیم‌ها وارد سلول شدند و مرگ سلولی را به سلول‌های سرطانی Hella القا کردند. میزان زنده‌مانی سلول‌ها نیز به‌روش MTT assay اندازه‌گیری شد. براساس این تحقیق، مشخص شد که آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی فعالیت آنزیمی و توکسیتی مشابهی با آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی دارد و برای استفاده به‌عنوان توکسین در تولید ایمونوتوکسین‌ها جانشین مناسبی است.

واژه‌های کلیدی: آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند، بیوانفورماتیک، سمیت سلولی، فعالیت زیستی.

مقدمه

آنزیم‌های RNase براساس نحوهٔ تخریب RNA در دو دستهٔ اگزونوکلئازها (یعنی RNA دی‌پلیمرازهایی که از انتها شروع به تخریب RNA می‌کنند) و اندونوکلئازها (یعنی RNA دی‌پلیمرازهایی که از درون اقدام به تخریب RNA می‌کنند) جای می‌گیرند. دستهٔ اخیر تحت‌عنوان ریبونوکلئازها یا به‌اختصار RNaseها شناخته می‌شوند (۲۲). آنزیم‌های ریبونوکلئاز گروهی از آنزیم‌ها هستند که با شکستن

۱-دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲-استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳- استادیار، گروه علوم دامی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: nassiryr@um.ac.ir
DOI:10.22067/ijasr.2020.38319.0

پیوند فسفودی‌استر بین نوکلئوتیدها موجب تجزیهٔ آن‌ها می‌شوند. این ویژگی این آنزیم‌ها باعث می‌شـود که در آزمایشـگاه‌های زیسـتی کارکردهای متنوع و متعددی داشـته باشـند، ازجمله برای اسـتخراج DNA، آنالیز توالی RNA و نقشـه‌یابی RNA، و به‌عنوان نشـانگر وزنی مولکولی؛ بنابراین، تولید تجاری آنزیم‌های ریبونوکلئاز اهمیت فراوانی دارد (۶).

آنزیم های RNase در اکثر موجودات زنده وجود دارند، اما در نشخوارکنندگان، به‌دلیل سیستم گوارشی منحصربه‌فرد این جانداران، بیشتر تولید می شوند (۳). به‌طورکلی، این آنزیم‌ها در نشخوارکنندگان سه همولوگ دارند که به‌ترتیب عبارت‌اند از همولوگ مغزی، همولوگ سـمینال و همولوگ پانکراسـی (۴). باتوجه‌به اینکه دسـتگاه گوارش نشخوارکنندگان وابسته به تخمیر میکروبی است و این مکانیسم سبب تولید حجم زیادی از پروتئین‌ها، DNA و RNA میکروبی می‌شـود، نشـخوارکنندگان برای هضـم این فرآورده‌های تخمیری نیازمند تولید حجم بیشتری از آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ این ترکیبات هستند که دربارهٔ RNase این موضوع ثابت شده است: مشاهدات نشان داده‌اند که سلول‌های برون‌ریز پانکراس این موجودات حجم بسیاری از آنزیم‌های RNase تولید می‌کنند (۶) که آن‌ها را، براساس میزان تولید، به‌ترتیب RNase A، B، C و D نامیده‌اند. دراین‌بین، RNase A شناخته شده تر است (۳).

اولین‌بار، در سال ۱۹۴۰ آنزیم RNase پانکراتیک از پانکراس گاو به‌دست آمد؛ بعد از آن، استخراج این آنزیم از حیواناتی مانند گوسفند، موش، خوک، اسب و بز نیز صورت گرفت (۵). در سال‌های بعد، از RNase پانکراس گاوی همچنین به‌عنوان مدلی برای بررسـی پیچ خوردگی پروتئین‌ها، کسب اطلاعات دربارهٔ باندهای دی سولفیدی و همچنین مطالعات کریستالوگرافی استفاده کردند. امروزه، این آنزیم به عنوان یک عامل القاکنندهٔ مرگ سلولی نیز شناخته می شود که این کار را با ازبین‌بردن RNA سلولی انجام می‌دهد (۵، ۳۰). ازمیان تمام RNaseهای شناخته شده، فعالیت آنزیمی RNase A یا همان آنزیم پانکراس گاوی بیشتر گزارش شده است. براساس مطالعات، میزان فعالیت آنزیمی RNase پانکراتیک گوسفندی برابر با ارتولوگ[1] گاوی آن اسـت (۱۲)، اما مطالعات چندانی دربارهٔ این آنزیم که آن را به‌نام RNase A گوسفند می‌شناسیم صورت نگرفته است.

آنزیم RNase A گوسفند ۱۲۴ آمینواسید دارد، وزن مولکولی آن درحدود ۱۳/۷۱ دالتون است، و در ساختار خود ۴ باند دی‌سولفیدی بین سـیسـتئین‌های شـمارهٔ ۲۶ با ۸۴ ، ۴۰ با ۹۵، ۵۸ با ۱۱۰ و ۶۵ با ۷۲ دارد. جایگاه اتصـال RNase A در اسـیدآمینه‌های ۷، ۱۰، ۶۶ و ۸۵ است. شکل ظاهری آن نیز شبیه لوبیاست که جایگاه فعال این آنزیم در ناف لوبیا قرار دارد. دو اسیدآمینهٔ هیستیدین ۱۲ و هیستیدین ۱۱۹ در این جایگاه قرار گرفته‌اند. این اسـیدآمینه‌ها عمل کاتالیز آنزیم را انجام می‌دهند. اسیدآمینهٔ ۳۴ نیز گلیکولیزه است (۳۲). علی‌رغم تمام موانع پیش‌رو، یک ویژگی خاص در RNase A سبب شده است که تحقیقات دربارهٔ این آنزیم به‌عنوان یک ایمونوریبونوکلئاز امیدبخش همچنان ادامه داشته باشد. این ویژگی نبودِ گیرندهٔ سطح سلولی برای این آنزیم در بدن است که آن را از ایمونوتوکسین‌های مشابه متمایز می‌کند (۲۳).

تاکنون، شـرکت‌های تجاری بسـیاری موفق به تولید آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی شده‌اند. اما، درمیان گونه‌های نشخوارکننده، گوسـفندان را نیز می‌توان به‌عنوان یک گونهٔ مناسـب برای تولید این آنزیم مدنظر قرار داد. باتوجه‌به ظرفیت نژادی گوسفند در ایران، به‌نظر می‌رسـد که ما ازطریق مطالعات مولکولی و فیلوژنیک ژن مربوط به آنزیم پانکراس گوسفندی بتوانیم زمینه را برای بررسی‌های بیشتر و تولید یک پروتئین نوترکیب در آینده فراهم سـازیم. نظر به‌اینکه مشـاهدهٔ بررسـی‌های انجام‌شـده نشـان می‌دهد که برای بهبود اثرات مرگ سلولی این آنزیم هنوز اصلاحاتی در آن ایجاد نشده است، هدف از این پژوهش بررسی همین موضوع است.

مواد و روش

پیش‌بینی شکل سه‌بعدی

در ابتـدا، شـکـل سـه‌بعـدی آنزیم مـدنظر از سـایـت http://www.rcsb.org/ به‌شـمارهٔ 10.2210 /pdb1YV6/pdb، 10.2210/pdb3SNF/pdb که به‌نام آنزیم طبیعی ریبونوکلئاز گاوی ثبت شده است به‌دست آمد. به‌دلیل دردسترس‌نبودن ساختار RNase A گوسفندی، شکل سه‌بعدی آنزیم RNase A گوسفندی با استفاده از این اطلاعات پیش‌بینی شد؛ سپس، این ساختار سه‌بعدی ریبونوکلئاز پانکراس گوسـفنـدی نیز بـه‌وسـیلـهٔ نرم‌افزار I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) پیش بینی گردید. درادامه، صحت ساختار پیش‌بینی‌شده با استفاده از نرم افزار SAVESv5.0 (https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/) سنجیده شد. بدین‌ترتیب که ابتدا شکل سه‌بعدی پیش‌بینی‌شده به‌وسیلهٔ پلات راماچاندرا بررسی و برای انجام‌دادن اصلاحات شکل سه‌بعدی پیش‌بینی‌شـدهٔ اولیه بـه نرم‌افزار گلکسـی بـه‌آدرس http://galaxy.seoklab.org/refine فرسـتاده شـد و نتیجه دوباره به‌وسیلهٔ پلات راماچاندرا بررسی گردید (۱۱).

همچنین، خواص فیزیکو شیمیایی آنزیم ریبونوکلئاز گاو و گوسفند نیز به‌کمک سایت پرات پارام (https://web.expasy.org/protparam/) بررسـی گردید. درانتها، به‌وسـیلهٔ نرم‌افزار SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/) شـکل سـه‌بعدی آنزیم

1- Orthologue

ریبونوکلئاز پانکراس گاوی هم تأیید شد. ساختار RNase A پیش‌بینی شـده برای شـبیه‌سـازی در برنامهٔ گرومکس (Gromacs (ver 5 software Linux (ver 17) با اسـتفاده از فورس‌فیلد CHARM بررسـی گردید. مولکول مدنظر در یک مکعب که درون آن ۵۹۲۲ مولکول آب قرار گرفته بود در pH طبیعی بدن ازطریق اضافه‌کردن ۸ مولکول کلر در فاصلهٔ ۷ آنگسترومی پروتئین مدنظر قرار گرفت. بهینه سازی انرژی در ۳۰۰ درجهٔ کلوین انجام شد. شبیه‌سازی MD[1] میزان پایداری پروتئین را از ۱ درجه تا ۳۰۰ درجهٔ کلوین و در ۴۰ نانوثانیه بررسی کرد که در این بررسی مقادیر rmsd[2]، rmsf[3] و Rg[4] به‌دست آمد.

تهیهٔ سـازه‌های لازم برای تولید پروتئین ریبونوکلئاز پانکراس در باکتری *ایکولای* BL21

درابتدا، توالی پروتئین مدنظر با کمک نرم‌افزار clc به‌صـورت مجازی در داخل ناقل pET21b قرار گرفت. به‌دلیل انتخاب سـایت های برشی *Xba*I، *Hind*III که مانع عملکرد سیگنال پپتاید PelB leaderموجود در وکتور می‌شـوند، سـیگنال پپتاید PelB leader به منظور بیان پروتئین در فضای پری‌پلاسمیک به ساختار مدنظر اضافه شد. سپس، ساختار طراحی‌شدهٔ توسط شرکت Shanghai, GenRay (China) به‌منظور بیان در *ایکولای* و بهینه سازی کدون به‌کار گرفته شد و توالی از طریق این شرکت سنتز شد. ابتدا، ساب‌کلون توالی در داخل وکتور pGH و سـپس در درون وکتور pET21b بین دو آنزیم بر شی *Xba*I و *Hind*III کلون شد. انتقال وکتور pET21b به‌همراه توالی مدنظر به داخل میز بان بیان (BL21(DE3 به‌منظور تولید پروتئین مدنظر انجام گرفت. سـپس، به‌وسـیلهٔ کلونی PCR، انتقال وکتور تأیید شـد که درنهایت کلونی مدنظر برای بیان در باکتری *ایکولای* نیز تأیید گرفت.

بعد از این مرحله، در محیط کشـت LB، سـلول‌ها به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و به‌صورت متحرک، با سرعت 180 rpm، کشت داده شدند. درانتها، ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به ۲ لیتر محیط کشـت LB که شـامل 100 µg/ml ampicillin بود اضافه و کشت داده شد تا محیط کشت به غلظت مدنظر (OD 600) برسد.

همچنین، به‌منظور بیان پروتئین به‌مقدار 1.5 mM از D-1 isopropy β- thiogalactoside (IPTG)نیز به محیط کشت اضافه شد. ابتدا، نمونه‌گیری به‌منظور بهینه‌سازی زمان تولید به‌صورت ساعتی انجام گرفت که درنتیجهٔ آن معلوم شد ساعت پنجم بیشترین میزان تولید را دارد؛ به‌همین‌دلیل، نمونه به‌مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفت و سپس برای جمع‌آوری سلول‌ها در سانتریفیوژ با سرعت 12000 g در ۴ درجه انجام و محلول بالایی خارج شد. سلول‌ها برای بررسی اولیه با الکتروفروز (SDS-PAGE[5]) تأیید شدند.

تخلیص پروتئین

به‌دلیل وجود سـیگنال پپتید PelB در توالی مدنظر بیان پروتئین در فضـای پری‌پلاسـمیک صـورت گرفته بود که ازهمین‌روی برای خالص سازی پروتئین می‌بایست از روش شوک اسموتیک استفاده می‌شد (۱۱).

درانتها، به‌منظور القا به داخل سـلول‌ها بافر هایپرتونیک (-Tris Hcl 30mM, EDTA 1 mM ,Saccharose 20%, pH=8) به‌مقدار ۲۵ میلی‌لیتر به محلول اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه برروی یخ قرار گرفت. محلول به‌دسـت‌آمده به‌مدت ۲۰ دقیقه با سـرعت 8000 g سانتریفیوژ شد و محلول بالایی از آن جمع‌آوری گشت. پلت به‌دست آمده در hypotonic 5 mM $MgSO_4$ 25 ml به‌صـورت محلول به‌دست آمد. محلول به‌مدت ۳۰ دقیقه برروی یخ قرار گرفت و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت 8000 g سانتریفیوژ شد. درنهایت، محلول بالای به‌دسـت‌آمده جمع‌آوری شـد و به‌مدت ۱۶ سـاعت در محلول لایـزیـز (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH: 8.0) قرار گرفت.

به‌منظور تخلیص پروتئین از ستون Q-sepharose استفاده شد. ابتدا، ستون سه‌مرتبه با محلول پروتئین مدنظر شست‌وشو داده شد و ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی که شـامل پروتئین می بود در دمای ۴ درجه ازطریق سـتون فیلتر شـد. بعد از این مرحله، پروتئین مدنظر با غلظت های مختلف محلول نمکی NaCl 0.3, 1, 2, 3 (0.1, 0.2) مولار از ستون شست‌وشو داده شد. محلول‌های حاصل از فیلترکردن ستون به‌وسیلهٔ غلظت‌های مختلف نمکی جمع‌آوری شد و برروی ژل SDS-PAGE وجود پروتئین مدنظر دراین محلول هل مورد بررسـی قرار گرفت تا مناسب‌ترین غلظت محلول نمکی که شامل پروتئین موردنظر بود به‌دست بیاید. درانتها، غلظت پروتئین استخراج شده با استفاده از روش برادفورد تعیین گردید (۱۴).

بررسی فعالیت RNase

بررسی فعالیت آنزیمی RNase A گوسفندی طبیعی با روش تری پاتی و همکاران (۲۰۱۳) انجام گرفت (۲۶). درابتدا، RNA مخمر با

1- Molecular dynamics
2- Root mean square deviations
3- root mean-square fluctuation
4- gyration radius
5- Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

محلول اتیدیوم بروماید مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد؛ سپس، ۲ میکرولیتر از ریبونوکلئاز با غلظت ۲ میکرومول به آن اضـافه شـد و تغییرات غلظت فلورسنت آن به‌مدت ۳۰۰ ثانیه و در طول موج ۵۱۰ تا ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۲۶). این آزمایش، همچنین، با ۵ غلظت مختلف از RI (RNase inhibitor) (Thermo, USA) نیز انجام گرفت (۱۹، ۲۰).

مقاومت درمقابل پروتئازها

ریبونوکلئاز RNase A با غلظت 0.2 mg/mL پپسین به آنزیم به نســبت ۱ به ۲ در دمای ۳۷ درجه و در داخل محلول 50 mM glycine–HCl در PH 2.4 قرار گرفت. از یـک آنزیم تجـاری ریبونوکلئاA (Qiagen, USA) به‌عنوان شاهد در این آزمایش استفاده شـد. در زمان‌های مشـخصـی نمونه‌گیری انجام گرفت و همچنین به منظور تنظیم PH نمونه از محلول ۲ مولار تریس اســتفاده شــد که درنهایت به‌وسیلهٔ SDS-PAGE بررسی گردید (۲۹).

آزمون MTT

به‌منظور بررسـی فعالیت ضـدسـرطانی آنزیم مدنظر، ردهٔ سـلولی سرطانی Hella آماده برای کشت در داخل پلیت ۹۶خانه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۷٪ به‌مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت و سپس برای اطمینان‌یافتن از زنده‌بودن سلول‌ها ر شد و حرکت آن‌ها بررســی گردید. بعد از این، اثر افزودن آنزیم ریبونوکلئاز بر این ردهٔ ســلولی در ۷ غلظت مختلف (3000 ng، 2500 ng، 2000 ng، 1500 ng، 1000 ng، 500 ng، 100 ng) با ۳ تکرار آزمایش شد و همچنین IC50 نیز محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری میزان زنده‌مانی ســلول 20 ml از محلول MTT[1] با غلظت 5 mg/ml که با PBC رقیق شده بود به پلیت‌ها اضافه شد.

نتایج

مقایسهٔ خصوصیات فیزیکوشیمیایی

در این مطالعه، خواص فیزیکو شیمیایی آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس در گـاو و گـوســـفـنـد تـوســـط نـرم‌افـزاز پـرات پـرام (https://web.expasy.org/protparam/) بررسـی و مقایســه شـد (جدول ۱).

بررســی‌های بیوانفورماتیکی ســاختار آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند

بررسی‌های شکل سه‌بعدی پیش‌بینی شدهٔ ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی با پلات راماچاندرا، قبل و بعد از اصلاحات اولیه، شکل سه بعدی پیش‌بینی‌شده را تأیید می‌کند. همان‌طورکه در شکل ۱ مشاهده می شود، تمرکز اسیدهای آمینه در ناحیهٔ پایدار افزایش یافته است و حدود ۹۸٫۴٪ از آن‌ها در قســمت‌های قرمزرنگ و آبی‌رنگ که ناحیهٔ پایداری است متمرکز شده است (۱۵).

مقایسهٔ ساختار سه‌بعدی آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی و گاوی نشان داده است که باوجود ۴ جهشی که در آنزیم گاوی نسبت به نوع گوســفندی در جایگاه های A19S، K37Q، V46F و N103Eوجود دارد، این امر هیچ تأثیری برروی گرایش و شـکل ســه بعدی آنزیم گوسفندی نگذا شته است و هر دو آنزیم کاملاً شبیه هم هســتند (شـکل ۲). همچنین، هردوِ آن‌ها کاملاً با آنزیم RI براسـاس داده‌های بیوانفورماتیکی مهار می‌شوند. میزان شباهت این دو آنزیم به یکدیگر درحدود ۹۹٫۷۷٪ است (۳).

همان‌طورکه بیان شـد، طی این تحقیق، مطالعات و بررسـی‌های آنزیمی هم دربارهٔ آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند صورت گرفت. این مطالعات بیوانفورماتیکی نشـــان داد که تفاوت در ۴ آمینواســـید تأثیری بر نحوهٔ اتصـــال به RI ندارد؛ بااین‌حال، ازآنجاکه بنابه نظر محققان این‌گونه مطالعات به یک شـــاهد تأییدشـــده نیاز دارد، به‌این منظور از داده‌های کریستالوگرافی آنزیم گاوی برای بررسی‌های بیشتر و افزایش قابلیت اطمینان استفاده شد. این داده‌ها نشان از درست‌بودن اطلاعات آنزیم گوسفندی داشت (شکل ۳) که البته این نتایج ازطریق شبیه‌سازی MDS[2] نیز تأیید شدند (شکل۴) (۳۵).

تولید آنزیم طبیعی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند

مطالعات نشان داده‌اند که وجود سیگنال پپتاید PelB باعث تولید پروتئین در فضای پری‌پلاسمیک می‌شود که فضای مناسب‌تر و خلوت تری نسبت‌به فضای سیتوپلاسمیک دارد (۱۲، ۲۴). ژن RNase A که ۳۶۹ جفت باز دارد و بین ۲ سـایت برشـی *XbaI* و *HindIII* قرار گرفته است به‌وسیلهٔ هضم دوتایی در داخل کلونینگ سایت pET-21b قرار می‌گیرد. طی این تحقیق، با استفاده از کیت اتصال، توالی مدنظر به داخل *E. coli* BL21 (DE3)انتقال داده شـــد و ســـپس ازطریق کلونی PCR انتقال سازه تأیید شد (شکل ۵). تولید پروتئین طبیعی ریبونوکلئاز پانکراس گوســفند به‌اندازهٔ 13.7 کیلودالتون هم با SDS-PAGE تأیید شد. تخلیص این پروتئین به‌وسیلهٔ شوک اسمزی و ســتون Q-Sepharose انجام گرفت و ســپس ازطریق الکتروفروز تأیید شد (شکل ۶). این مطالعات از تولید پروتئین به صورت کامل در سلول‌های مدنظر و فضای سیتوپلاسمی حکایت داشتند. با کمک روش برادفورد میزان غلظـت پروتئین طبیعی تولیدشـــده نیز ۴٫۷۸mg/ml برآورد شد.

فعالیت آنزیمی و مقاومت دربرابر پپسین

1- 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

2- Molecular dynamics simulation

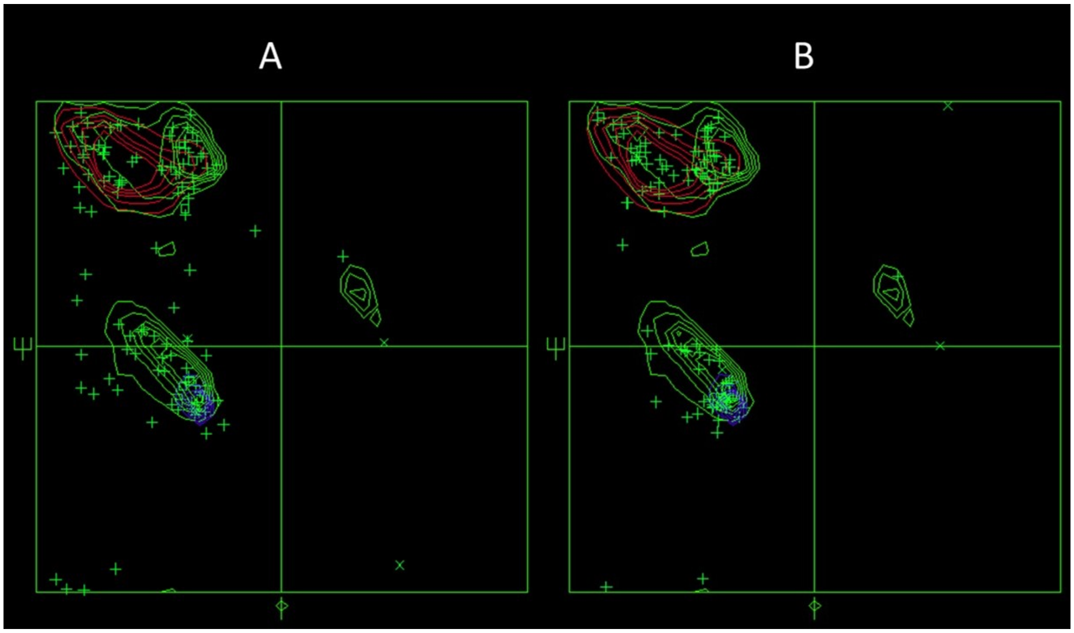
براساس مطالعهٔ انجام‌گرفته برای سنجش فعالیت آنزیمی، فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز طبیعی پانکراس گوسفند 558 U/mol ±22 تخمین زده شد. همان‌طورکه روتوسکی در سال ۲۰۰۸ نشان داده است، سمیت سلولی رابطهٔ مستقیمی با میزان فعالیت آنزیمی این آنزیم‌ها دارد (۳۰). در این مطالعه، از RNase A گاوی به‌عنوان شاهد استفاده شد که میزان فعالیت آنزیمی اندازگیری‌شده مشابه اطلاعات ارائه شدهٔ فروهر مهر و هم‌کاران (۲۰۲۰) بود (۱۰). همچنین، در این تحقیق آنزیم تولیدشده به‌وسیلهٔ پپسین انکوبه شد تا میزان مقاومت آن درمقابل پروتئازها اندازگیری شود. آنزیم مدنظر پس از ۲۲ ساعت انکوبه در پپسین به‌میزان ۹۰٪ دست‌نخورده باقی ماند.

اثر سیتوتوکسیتی RNase گوسفند برروی ردهٔ سلولی Hella

به‌منظور بررسی میزان سیتوکسیتی RNase از روش MTT assay استفاده شد و همچنین RNase A گاو به‌عنوان شاهد مدنظر قرار گرفت. در آغاز (شکل ۷)، در حضور آنزیم RNase A گاو و گوسفند، این آنزیم‌ها وارد سلول نشدند و درنتیجه هیچ فعالیت سیتوتوکسیتی نشان ندادند، ولی پس از تیمار با لیپوفکتامین ۳۰۰۰ (Thermo, USA) براساس روش ارائه‌شدهٔ سلر و همکاران در سال ۱۹۹۵ -این تحقیقات در سال ۲۰۱۴ بازبینی شد- آنزیم مدنظر وارد سلول‌ها شد (۲۵). بعد از ورود آنزیم‌ها به سلول‌ها، مرگ سلولی به سلول‌های سرطانی Hella القا شد. سپس، با بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌ها میزان فعالیت سیتوکسیتی آنزیم نیز اندازه‌گیری شد.

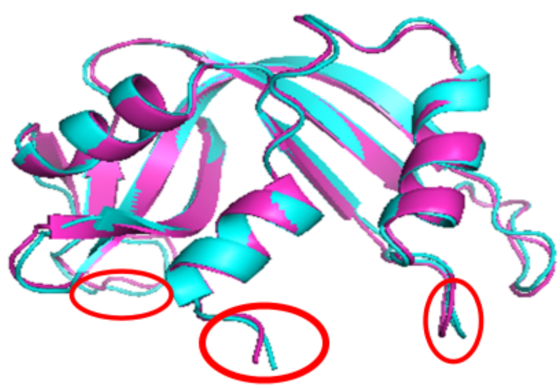
جدول ۱- مقایسهٔ خصوصیات فیزیکوشیمیایی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند و گاو
Table 1- Comparison of physicochemical properties of Ovine and Bovine panceratic RNase A

ریبونوکلئاز پانکراس Pancreatic ribonuclease	Bovine گاو	Ovine گوسفند
تعداد اسیدآمینه Number of amino acids	124	124
وزن مولکولی Molecular weight	13690.29	13707.23
نقطه ایزو الکتریک pI Theoretical pI: 8.64	8.64	8.15
مقدار بار مثبت Total number of positively charged residues	10	11
مقدار بار منفی Total number of negatively charged residues	14	13
فرمول اتمی آنزیم Formula	$C_{575}H_{909}N_{171}O_{193}S_{12}$	$C_{574}H_{904}N_{170}O_{196}S_{12}$
تعداد اتم‌ها Total number of atoms	1860	1856
نیمه‌عمر در گولبولهای قرمز نابلغ پستانداران half-life (mammalian reticulocytes, in vitro)	1.3 hr.	1.3 hr.
نیمه‌عمر پروتئین در سلول‌های مخمر (yeast, in vivo)	3 min.	3 min.
نیمه‌عمر پروتئین در *ایکلای* (*Escherichia coli*, in vivo)	3 min.	3 min.
شاخص پایداری The instability index	42.12	44.26
شاخص ابدوستی Aliphatic index	46.45	45.65
متوسط هیدروپاتی Grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0.663	-0.681



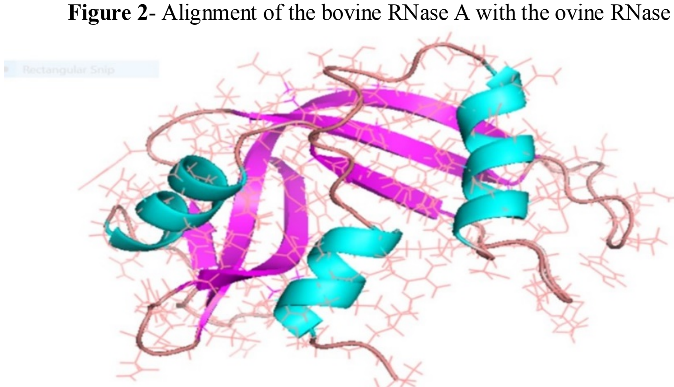
شکل ۱– پلات راماچاندرا. A– پلات راماچاندرا قبل از انجام اصلاحات B– پلات راماچاندرا بعد از انجام‌شدن تصحیحات

Figure 1- The Ramachandran plot (A) The Ramachandran plot of initial model (B) The Ramachandran plot of refined model



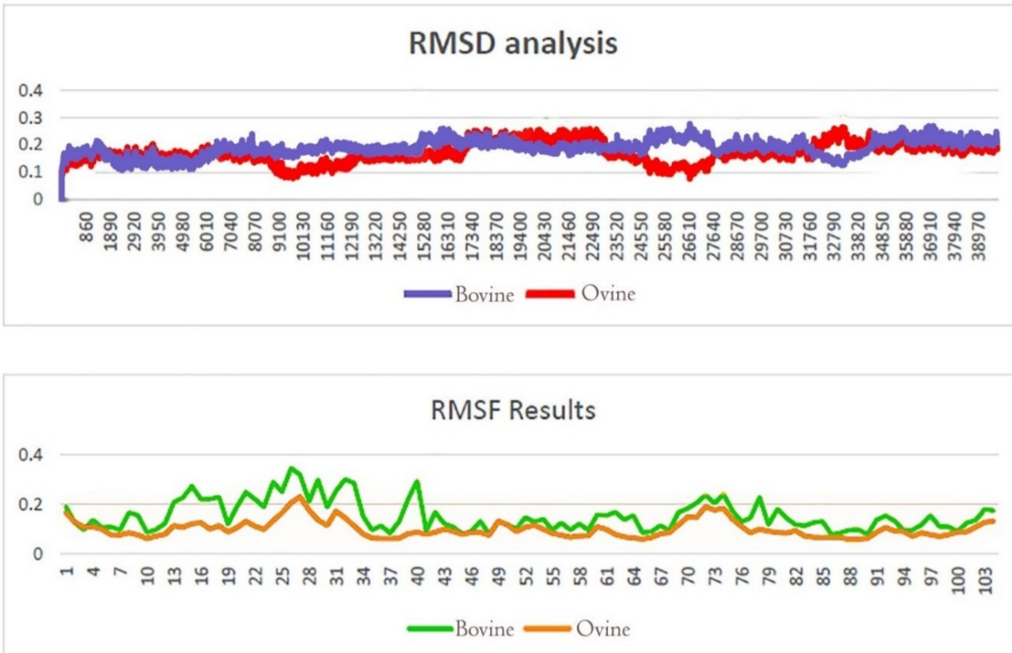
شکل ۲– هم‌ردیفی ریبونوکلئاز پانکراس گاو با ریبونکلئاز پانکراس گوسفند

Figure 2- Alignment of the bovine RNase A with the ovine RNase A



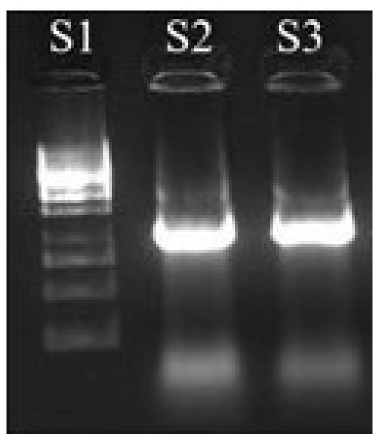
شکل ۳– ساختار سه‌بعدی RNase A گوسفند

Figure 3- 3D structure of the ovine RNase A



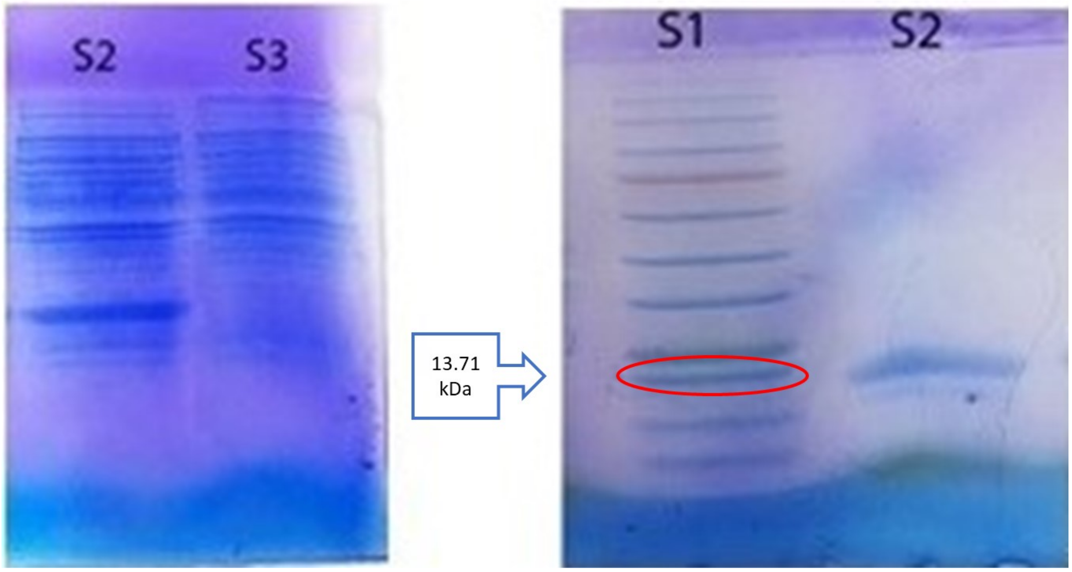
شکل ٤- RMSD و RMSF شبیه‌سازی آنزیم ریبونوکلئاز طبیعی گاو و گوسفند نشان‌دهندهٔ ثبات و تعادل ساختار این دو آنزیم است.

Figur 4- RMSD and RMSF analysis confirmed the stability of the ovine RNase.



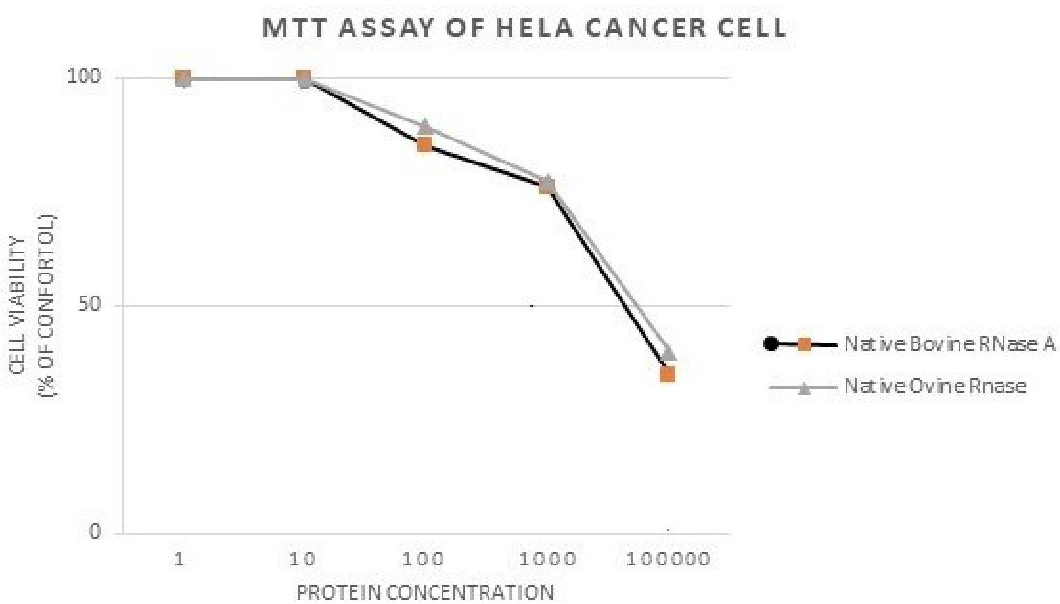
شکل ۵- نتیجهٔ حاصل از کلونی PCR ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند.S1: مارکر+M100 (شرکت ترمو، آمریکا)، S2 وS3 : RNaseA طبیعی

Figure 5- The colony PCR of ovine RNase A, S1: M 100+ marker (Thermo, USA), S2 and S3: Native ovine RNase A.



شکل ٦– چپ: تولید پروتئین ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند. S2: پروتئین طبیعی پانکراس گوسفندی، S3: E coli BL21(DE3) with pET 21b (+). راست: نتایج خالص سازی پروتئین. S1: لدر پروتئین (Thermo, USA)، S2: نتیجهٔ خالص‌سازی پروتئین طبیعی گوسفند

Figure 6- Left: Recombinant protein production in *E. coli* BL21(DE3), S2: native ovine RNase A protein, S3: E. coli BL21(DE3) with pET 21b (+). Right: purification of the ovine RNase A. S1: protein ladder (Thermo, USA), S2: native ovine RNase A protein.



شکل ۷– نتایج MTT assay آنزیم RNase طبیعی گاو و گوسفند بر روی رده سلول های سرطانی HeLa

Figure 7- MTT assay of native and mutant ovine and bovine RNase A on HeLa cancer cell line.

بحث

مطالعات نشـان داده‌اند که بررسـی‌های اسـتاتیکی و دینامیکی راهکار مناسبی برای بررسی پایداری پروتئین‌ها پیش‌روی ما می‌نهند.

ما نیز در بررســـی های MDS با اندازه‌گیری RMSD، RMSF و Gyration curves میزان پایداری آنزیم تولید شده را بررسی کردیم. اطلاعات بهدستآمده طی این تحقیق با داده‌های حاصل از مطالعات سال‌های قبل کاملاً همپوشانی و همخوانی داشت (۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و

۳۳). در این پژوهش، با تأیید پایداری آنزیم به‌واسطهٔ اطلاعات دینامیکی از فعال‌بودن آنزیم نیز اطمینان حاصل شد. مقاومت آنزیم درمقابلِ پپسین هم نشان از ساختار صحیح آنزیم تولیدی داشت، زیرا در سال ۱۹۸۴ اسمیت و همکاران نشان داده‌اند که آنزیم فقط با داشتن ساختار صحیح قابلیت مقاومت در حضور پپسین را خواهد داشت (۲۸). ما در مطالعات MDS آنزیم مدنظر را مدل قرار دادیم، چه‌اینکه در بررسی‌های پیشین RNase A گاوی مدل کریستالوگرافی آن مدنظر قرار گرفته است (۱۰، ۱۸ و ۲۳).

ازآنجاکه آنزیم مدنظر ما شباهت بسیار زیادی به آنزیم گاوی دارد و تنها در ۴ اسیدآمینه با آن متفاوت است، انتظار می‌رود که یک آنزیم مناسب با قابلیت بالا برای استفاده به‌عنوان توکسین باشد. ما در مطالعات MDS پس از بررسی RNaseA گاو در شکل کریستالوگرافی ثبت‌شده RNase A گوسفند را جانشین ساختیم. این شبیه‌سازی آنزیم RNase A طبیعی گوسفند و گاو نشان از شباهت زیاد بین این دو آنزیم و میزان تعادل بالای آن‌ها در فشار ۱ اتمسفر و دمای بدن داشت که ازطریق مسیرهای آزمایشگاهی نیز تأیید شد (۱۰و ۱۸). مطالعاتی که در سال‌های اخیر انجام گرفته است نشان داده‌اند که بسیاری از ریبونوکلئازها، مانند انکوناز، ریبونوکلئاز سمینال گاو و نیز ریبونوکلئاز پانکراس گاو، وقتی به‌عنوان یک ایمونوتوکسین از آن‌ها استفاده شده است، بعد از ورود به سلول‌های سرطانی مانع از تولید پروتئین در آن‌ها شده‌اند (۱، ۷، ۹، ۱۶، ۱۹، ۲۷و ۳۰).

ساندلس و همکاران (۲۰۱۱) ۱۳ نوع پروتئین از نوع آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس قورباغه راناپیراناز تولید کردند و با این پروتئین‌ها اثرات پیوندهای بین RNase A و RI را آشکار ساختند. باتوجه‌به این تحقیقات، به‌نظر می‌رسد می‌توان از RNase A گوسفند یک آنزیم جهش‌یافته تولید کرد که توانایی فرار از RI را داشته باشد، زیرا همان‌طورکه بررسی‌ها نشان داده‌اند RNase A گاو و گوسفند در حضور RI کاملاً غیرفعال می‌شوند (۲۹). طی یک دوره مطالعات در سال ۲۰۲۰، فروهر مهر و همکاران از RNase A گاو یک نوع آنزیم جهش‌یافته تولید کردند که قابلیت فرار از RI را داشت (۱۰).

مطالعات و بررسی‌ها نشان داده‌اند که از آنزیم مهندسی‌شدهٔ RNase A گاو و گوسفند می‌توان به‌عنوان توکسین در ایمونوتوکسین ها به‌صورت فعال بهره گرفت. همان‌طورکه بیان شد، RNase A طبیعی قابلیت سمیت در سطح سلول را ندارد که این، خود، یک مشخصهٔ مثبت برای این آنزیم‌هاست، زیرا بدین‌ترتیب می‌تواند با اتصال به آنتی‌بادی به‌صورت انتخابی وارد سلول مدنظر شود و مرگ سلولی را به سلول‌های سرطانی القا کند (۱۴). البته ما در این تحقیق به‌منظور بررسی سمیت RNaseA طبیعی و القای مرگ ازطریق آن با استفاده از لیپوفکتامین برای ورود آنزیم به سلول سمیت این آنزیم طبیعی را بررسی کردیم.

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه نشان داد که آنزیم RNase A گاو و گوسفند شباهت فراوانی به یکدیگر دارند و RNase A گوسفندی قابلیت زیادی برای تولید تجاری و القای مرگ سلولی به سلول‌های سرطانی دارد. همچنین، مشخص شد که آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند، مانند آنزیم RNase A گاو، در خارج از سلول گیرنده سطح سلولی ندارد و وارد سلول نمی‌شود، زیرا RI آن را کاملاً مهار می‌کند. این یعنی، درصورت مهندسی‌کردن این آنزیم و تولید یک آنزیم جهش‌یافته با حفظ فعالیت آنزیمی که توانایی فرار از RI را داشته باشد، می‌توان از آن به‌عنوان یک بدیلِ مناسب به‌مثابهٔ توکسین در ایمونوتوکسین‌ها استفاده کرد. آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی جانشین مناسبی برای استفاده به‌عنوان توکسین در تولید ایمونوتوکسین‌هاست، زیرا فعالیت و توکسیتی مشابه آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی دارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد با گرنت شمارهٔ ۳/۴۴۴۷۴ انجام یافته است.

منابع

1. Ardelt, W., K. Shogen, and Z. Darzynkiewicz. 2008. Onconase and amphinase, the antitumor ribonucleases from Rana pipiens oocytes. Current Pharmaceutical Biotechnology, 9(3):215-225.
2. Barnard, E. 1969. Biological Function of Pancreatic Ribonuclease. Nature, 221: 340- 344.
3. Becker, R. R., J. L. Halbrook, and C. Hirs.. 1973. Isolation and Characterization of Ovine Ribonuclease A, B, and C from Pancreatic Secretion. Journal of Biological Chemistry, 248:7826-7832.
4. Breukelman, H. J., N. Munnik, and R. Kleineidam. 1998. Secretory ribonuclease genes and pseudogenes in true ruminants. Gene, 212(2):259-68.
5. Beintema. J. J., and J. M. van der Laan. 1986. Comparison of the structure of turtle pancreatic ribonuclease with those of mammalian ribonuclease. The Federation of European Biochemical Societies, 194(2):338–343.
6. Claudi, M., M. Cuchillo, R. Victòria Nogués, and T. Raines. 2011. Bovine Pancreatic Ribonuclease: 50 Years of the First Enzymatic Reaction Mechanism. The Journal of Biochemistry, 50(37):7835–7841.
7. De Lorenzo, C., A. Nigro, R. Piccoli, and G. D'Alessio. 2002. A new RNase-based immunoconjugate selectively

cytotoxic for ErbB2-overexpressing cells. The Federation of European Biochemical Societies, 516(1-3):208-212.
8. De Lorenzo, C., A. Arciello, R. Cozzolino, D. B. Palmer, P. Laccetti, R. Piccoli, and G. D'Alessio. 2004. A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. Cancer Research, 64(14):4870-4874.
9. DelCardayr, S. B., M. Ribio, E. M. Yokel, D. J. Quirk, W. J. Rutter and R. T. Ruines. 1995. Engineering ribonuclease A: Production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Glnll. Protein Engineering, 18:261-273.
10. Forouharmehr, A., M. Nassiri, S. Ghovvati, and A. Javadmanesh. 2020. Production and introduction of a novel immunotoxin based on mutant RNase A for inducing death to Her1□positive cell lines. Journal of Cell Physiology, doi: 10.1002/jcp.29346
11. Forouharmehr, A., M. Nassiri, S. Ghovvati, and A. Javadmanesh, A. 2018. Different Signal Peptides for Secretory Production of Recombinant Bovine Pancreatic Ribonuclease A in Gram Negative Bacterial System: An In silico Study. Current Proteomics, 15: 24-31
12. Gesteland. R. F., and J. Atkins. 1993. The RNA World. Cold SpringHarbor LaboratoryPress Plainview, NY.
13. Ghovvati, S. 2014. Engineering ScFv-FC antibody bound to RNase to target HER2 antigen. Doctoral dissertation, Ferdowsi University. (In Persian)
14. He, F. 2011. Bradford Protein Assay. Biotechnology Innovation Organization, 101:e45. 10.21769.45.
15. Jaydarian, A., N. Nazifi, and A. Forouharmehr. 2020. Computational design of a novel multi-epitope vaccine against Coxiella burnetii. Human Immunology, 10:10-16.
16. Leich, F., N. Stohr, A. Rietz, R. Ulbrich-Hofmann, and U. Arnold. 2007. Endocytotic internalization as a crucial factor for the cytotoxicity of ribonucleases. Journal of Biological Chemistry, 282(38):27640-27646.
17. Lomax, J. E., C. M. Bianchetti, A. Chang, G. N. Phillips, B. G. Fox, and R. T. Raines. 2014. Functional evolution of ribonuclease inhibitor: insights from birds and reptiles. Journal of Molecular Biology, 426(17):3041- 3056.
18. Lu, L., J. Li, M. Moussaoui, and E. Boix. 2018. Immune Modulation by Human Secreted RNases at the Extracellular Space. Frontiers in Immunology, 9:1012.
19. Menzel, C., T. Schirrmann, Z. Konthur, T. Jostock, and S. Dubel. 2008. Human antibody RNase fusion protein targeting CD30+ lymphomas. Blood, 111(7):3830-3837.
20. Merlino, A., L. Mazzarella, A. Carannante, A. Di Fiore, A. Di Donato, E. Notomista, and F. Sica. 2005. The importance of dynamic effects on the enzyme activity: X-ray structure and molecular dynamics of onconase mutants. The Journal of Biological Chemistry, 6;280(18):17953-60.
21. Pikkemaat, M. G., B. M. Linssen, J. C. Berendsen, and D. B. Janssen. 2002. Molecular dynamics 355 simulations as a tool for improving protein stability. Protein Engineering, Design and Selection, 15:185–192.
22. Raines, R. T. 1998. Ribonuclease A. Chemical Review, 98:1045-1065.
23. Riccio, G., C. D. Avino, R. T. Raines, C. D. Lorenzo. 2013. A novel fully human antitumor ImmunoRNase resistant to the RNase inhibitor. Protein Engineering, Design & Selection, 26:243–248.
24. Rutkoski, T. J., and R. T. Raines. 2008. Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of 360 ribonuclease cytotoxicity. Current Pharmaceutical Biotechnology, 9(3):185-9.
25. Sells, M., J. Li, and J. Chernoff. 1995. Delivery of proteins into cells using cationic liposomes. BioTechniques, 19(1):72-6.
26. Stigh, E., G. Aqvist, and C. B. Anfinsen. 1958. The Isolation and Characterization of Ribonucleases from Sheep Pancreas. The Journal of Biological Chemistry, 234:1112-1117.
27. Schirrmann, T., J. Krauss, M. A. Arndt, S. M. Rybak, and S. Dubel. 2009. Targeted therapeutic RNases (ImmunoRNases). Expert Opinion on Biological Therapy, 9(1):79-95.
28. Schmid, F., and H. Blaschek. 1984. An early intermediate in the folding of ribonuclease A is protected against cleavage by pepsin. Biochemistry, 23(10):2128- 2133.
29. Sundlass, N. K., and R. T. Raines. 2011. Arginine residues are more effective than lysine residues in eliciting the cellular uptake of onconase. Biochemistry, 50(47):10293-9.
30. Turcotte, R. F., L. D. Lavis, and R. T. Raines. 2009. Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge. The Federation of European Biochemical Societies, 276(14):3846-3857.
31. Tripathy, D. R., A. K. Dinda, A. K., and Dasgupta, S. 2013. A simple assay for the ribonuclease activity of ribonucleases in the presence of ethidium bromide. Analytical Biochemistry, 437(2):126-9.
32. http://www.uniprot.org
33. Welling, G., Scheffer, A., and Beintema, J. 1974. The Primary structure of goat and sheep pancreatic ribonucleases. North-Holland Publishing Company – Amsterdam,41:58- 61.
34. Zeiske, T., Stafford, K. A., and Palmer, A. G. 2016. Thermostability of Enzymes from Molecular Dynamics Simulations. Journal of Chemical Theory and Computation, 14;12(6):2489-92

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 13, No. 3, Fall 2021, p. 429-440

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۳، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، ص. ۴۴۰-۴۲۹

Production of ovine Pancreatic Ribonuclease and investigation of enzyme characteristics

Mahsa Zabetian[1], Mohammadreza Nassiri[2], Ali Javadmanesh[3], Shahrokh ghovati[4]

Submitted: 25-10-2020
Accepted: 26-12-2020

Zabetian, M., M. R. Nassiri, A. Javadmanesh, and S. Ghovati. 2021. Production of ovine Pancreatic Ribonuclease and investigation of enzyme characteristics. Iranian Journal of Animal Science Research 13(3):429-440.

Introduction Obviously, the recent decades strategy in cancer therapy, anticancer drug discovery and drug improvement is to characterize, distinguish and validate the most promising cancer-related molecular targets to which new drugs can be designed. The unique features of the pancreatic RNase (RNase A) such as high activity, stability, lack of a cofactor, and small molecular size have made it the most popular enzyme in the ribonuclease family. Specifically, RNase A is involved in endonucleolytic cleavage of 3'-phosphomononucleotides and 3'-phosphooligonucleotides ending in C-P or U-P with 2', 3'- cyclic phosphate intermediates. RNase A was purified from the Bovidae family including bovine, ovine, bison, eland, goat and gnu. Although phylogenetic analyses of RNase A revealed high similarity among members of the Bovidae family, some functional mutations were also found.
Several studies showed that the RNA hydrolyzing action of ribonuclease is able to induce apoptosis and cell death in cancer cells, independently. This effect could be enhanced thousands of times when ribonuclease is linked to antibodies. These enzymes show potent cytotoxic activity on cell internalization but do not show sensible immunogenicity or non-specific toxicity toward normal cells. Ovine pancreatic ribonuclease enzyme is a member of super family RNase A, it can be a good candidate as a toxin for designing new drugs. The objective of this study was to produce ovine pancreatic ribonuclease enzyme in E. coli and characterize its activity.

Materials and methods All structures needed for this study were downloaded from the Protein Data Bank (PDB) website (http://www.rcsb.org/). PDB files (accession numbers: 10.2210 /pdb1YV6/pdb and 10.2210/pdb3SNF/pdb) related to natural Bovine Pancreatic RNase were selected. Gene synthesis and production of recombinant protein were conducted by using the pelB signal sequence at the beginning of the structure for periplasmic protein production. The native ovine RNase and bovine RNase A were optimized for E. coli host by GenRay codon optimization service and sent to GenRay Biotechnology (Shanghai, China) for synthesis. The target genes in pGH vector were sub-cloned in pUC19 and then cloned into the pET21b (+) vector between XbaI and HindIII sites. After transformation, E. coli cells containing recombinant pET21b (+) were cultivated in LB broth medium containing ampicillin. To extract the proteins, osmotic shock methods were applied. After that Q-sepharose chromatography was used to extract the target protein. Finally, Bradford analysis was used to determine the protein concentration. The ribonucleolytic activity of the recombinant native ovine RNase A was compared with native bovine RNase A following Tripathy et al (2013) method. To investigate the antitumor activity of recombinant proteins, HeLa cells were prepared for seeding in a 96-well flask and incubated at 37°C in 5% CO_2 for 72 h.

Results and discussion The production of native ovine and bovine RNase A was confirmed by SDS PAGE. Protein purification was successfully performed using osmotic shock in the Q-Sepharose column. Although our findings confirmed protein expression, no detectable proteins other than RNase A was observed in the LB medium, indicating that almost all the proteins were expressed either inside the bacterial cell or secreted into the periplasmic

1- Ph.D student, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2- Professor, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3- Assistant Professor, Department Animal Science, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4- Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Animal Science Department, University of Guilan, Iran.
(*-Corresponding author email: nassiryr@um.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.2020.38319.0

area. According to the Bradford analysis, the concentration of the recombinant proteins extracted was 4.78 ovine RNase A. Based on our results, it was shown that the ribonucleolytic activity of native ovine RNase A was 558±22. The results showed that RNase A exhibited resistance to pepsin degradation during the whole incubation process (22 h), in the course of which 90% of RNase A remained undamaged. To determine the cytotoxic effect of ovine RNase on the HeLa cell line, MTT assay was done following incubation with ovine RNase A. The commercial RNase A was used as control. The results showed that ovine RNase A and bovine RNase A had no cytotoxic effect on HeLa cells. When RNase treatment was done by the lipofectamine 3000 (Thermo, USA), the cytotoxicity effect was observed. Several studies have shown that some ribonucleases such as onconase, bovine seminal ribonuclease and bovine pancreatic ribonuclease have a great promise as cancer immunotherapeutic agents and cause a significant reduction in the protein synthesis of tumor cells after internalization into cytosol.

Conclusion Our findings demonstrate that ovine RNase similar to bovine RNase has a great potential for use in drug design industry. We revealed that the native ovine RNase A was more stable than the native bovine RNase. In future work, we intend to fuse the engineered ovine-RNase A to dedicated recombinant antibodies for cancer therapy and investigation of engineered immuno-ribonuclease potency and cell killing effects as a fusion protein.

Keywords: Bioinformatics, Biological activity, Cytotoxicity, Ovine pancreatic ribonuclease.